

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 octobre 2004 (28.10.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/092401 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/04,
C12M 1/28, 1/34, B01L 3/00

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy L'Etoile (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050140

(72) Inventeurs; et

(22) Date de dépôt international : 2 avril 2004 (02.04.2004)

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MER-
CADER BADIA**, Josep Vicent [ES/FR]; 34 rue Lt Cl
Girard, F-69007 Lyon (FR). **COLIN, Bruno** [FR/FR];
23 chemin des Garennes, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).
ATRACHE, Vincent [AU/FR]; 52 Cours Aristide Briand,
F-69300 Caluire (FR).

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

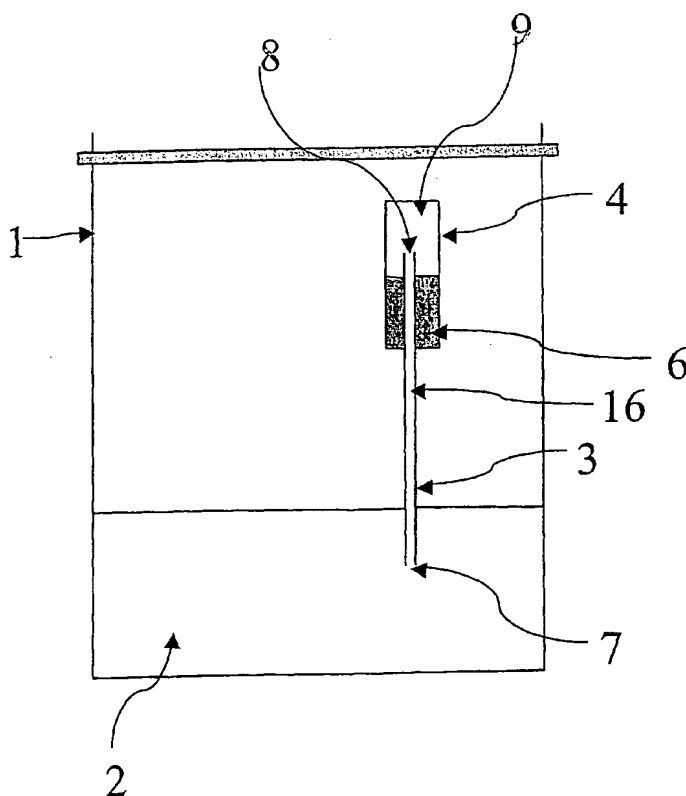
(30) Données relatives à la priorité :
0304262 7 avril 2003 (07.04.2003) FR

(74) Mandataire : **DENJEAN, Frédérique**; Chemin de
l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION AND/OR IDENTIFICATION OF BACTERIA PRESENT IN A SAMPLE

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DÉTECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE BACTÉRIES PRÉSENTES DANS UN ÉCHAN-
TILLON



(57) Abstract: The invention relates to a method for the detection and/or identification of bacteria present in a liquid or solid sample, characterised in that the sample containing said bacteria is placed in a liquid culture medium in a first container; a second container comprising at least one detection system is provided; a means for transferring between the first and second containers is provided; a temperature T1 is applied to the inside of the second container, then a temperature T2 is applied to the inside of the second container; the temperature T1 is greater than the temperature T2 such that a defined volume of culture medium is transferred from the first container to the second container; the presence or absence of bacteria is determined and/or the bacteria is identified in the detection system.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présentes dans un échantillon, liquide ou solide, caractérisé en ce que on place, dans un premier récipient, l'échantillon susceptible de contenir lesdites bactéries dans un milieu de culture liquide, on dispose d'un deuxième récipient comprenant au moins un système de détection desdites bactéries, on dispose d'un moyen de transfert entre le premier récipient et le deuxième récipient, on applique une température T1 à l'intérieur

[Suite sur la page suivante]

WO 2004/092401 A1



(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

du deuxième récipient puis, on applique une température T2 à l'intérieur du deuxième récipient la température T1 est supérieure à la température T2 de sorte que l'on transfère un volume défini de milieu de culture du premier récipient vers le deuxième récipient, on détermine la présence ou l'absence de bactéries et/ou on identifie les bactéries au niveau du système de détection.

S/PTS

10/ 551 989

JC05 Rec'd PCT/PTO 0 40 OCT 2005

1

Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présentes dans un échantillon

La présente invention concerne un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présents dans un échantillon, liquide ou solide. L'invention concerne également un dispositif de détection et/ou d'identification de bactéries présents dans un tel échantillon.

L'identification de bactéries dans les aliments, est indispensable pour la santé publique. Par exemple, les bactéries de genre *Salmonella*, qui peuvent être trouvées dans un grand nombre d'aliments, sont la cause de nombreuses pathologies chez l'homme (fièvre typhoïde, intoxication alimentaire). De même, l'isolement et l'identification de la bactérie *Listeria* est une obligation majeure de la surveillance de l'hygiène agro-alimentaire et de la bactériologie médicale. Ainsi, parmi les bactéries du genre *Listeria*, l'espèce *Listeria monocytogenes*, connue pour être pathogène pour l'homme peut engendrer la listériose, parfois mortelle (25 à 30 % des cas) chez les personnes immunodéprimées, les enfants en bas âge. Il est donc très important de disposer d'un test fiable et rapide permettant de détecter les contaminations par ces bactéries, lequel test doit être à la fois sensible et spécifique. Enfin, l'identification de bactéries du genre Staphylocoque est également primordial. La plupart de ces espèces sont des pathogènes opportunistes chez l'homme présentant un risque élevé en cas de blessure cutanée par un traumatisme ou par implantation directe d'un produit médical. D'ailleurs, l'espèce *Staphylococcus aureus* est une bactérie qui se retrouve souvent chez des patients qui doivent recevoir des soins hospitaliers faisant intervenir des appareils tels que seringues ou cathéters. Il y a donc un grand intérêt de détecter la présence de cette bactérie pathogène, de plus en plus impliquée dans les maladies nosocomiales.

Il existe actuellement de nombreux tests de détection de bactéries. D'une manière générale, ces tests de détection nécessite un préenrichissement comprenant :

- une étape de ressuscitation, permettant aux bactéries de récupérer du stress induit par la mise en culture et
- une étape de croissance exponentielle bactérienne, qui est indispensable lorsque peu de bactéries sont initialement présent dans l'échantillon et

- une étape de détection des bactéries, qui doit être préférentiellement réalisée au pic de croissance bactérienne, et avant l'apparition de la phase de mort bactérienne, qui est observée lors de toute culture bactérienne.

A titre indicatif de méthode de détection de bactéries, on peut citer le procédé de détection de *Salmonella* décrit dans le brevet US-A-4,563,418, qui est basé sur une immunoprécipitation. La détection de ces bactéries s'effectue, après l'étape de pré enrichissement et de croissance bactérienne, après migration dans un milieu de culture pré enrichi en *Salmonella* et une réaction avec des anticorps dirigés contre les *Salmonella*. On peut citer également une méthode comparable, basée également sur une immunoprécipitation qui est présentée dans le brevet US-A-5,132,229. Dans ces méthodes, l'utilisateur doit toutefois réalisée manuellement une étape de transfert du milieu de culture, pré enrichi en bactéries, vers le gel de migration, ce qui peut induire des problèmes notamment de contamination mais également des risques pour la santé du manipulateur.

On peut également citer des méthodes plus récentes, basées principalement sur la migration des bactéries à travers un milieu sélectif de l'espèce de bactéries que l'on souhaite spécifiquement détecter. Ainsi, la demande de brevet EP-A-0.259.116 présente un procédé pour détecter la présence de *Salmonella* dans un échantillon, le procédé comprenant la migration des *Salmonella* présentes dans un milieu de culture pré enrichi vers un milieu sélectif, spécifique des salmonelles. Les salmonelles migrent alors vers le système de détection, permettant leur identification, alors que les autres bactéries susceptibles d'être présents dans l'échantillon sont stoppés par le milieu sélectif. Toutefois, dans ce procédé, le milieu de culture reste en contact avec le milieu sélectif et le système de détection, ce qui constitue le problème majeur de ce type de procédé. Ainsi, si l'échantillon est fortement contaminé, les bactéries, autres que les salmonelles présentes dans le milieu de culture, peuvent alors saturer le milieu sélectif, qui ne joue plus alors son rôle de barrière sélective. La présence de bactéries, autres que les salmonelles, dans le système de détection peut alors constituer un faux positif : on détecte un système de détection positif alors que l'échantillon n'est pas contaminé en salmonelles. De plus, le procédé tel que décrit dans cette demande ne peut être mis en œuvre que pour des bactéries motiles.

La présente invention se propose de résoudre l'ensemble des inconvénients de l'état de la technique en présentant notamment un procédé pour la détection et/ou l'identification de bactéries, nécessitant peu de manipulations de la part du manipulateur, du milieu de culture comprenant les bactéries, tout en permettant un diagnostic rapide, directement depuis le milieu de culture, que l'on peut mettre aisément en place lors de la phase de croissance exponentielle bactérienne.

Avant d'aller plus avant, les définitions suivantes permettront de mieux comprendre la suite de l'exposé de l'invention.

10 Par échantillon, on entend un échantillon alimentaire, issu de tout type d'aliment, mais aussi un échantillon clinique, issu d'un prélèvement de liquide biologique. Cet échantillon peut être ainsi liquide ou solide et on peut citer d'une manière non limitative, un échantillon alimentaire d'eau, de boissons tels que le lait, un jus de fruits; échantillon clinique de sang, de plasma, d'urines, de fécès, un échantillon alimentaire de yaourt, de viande, d'œufs, légumes, mayonnaise, 15 fromage ; poisson..., un échantillon alimentaire issue d'une alimentation destinée aux animaux, tel que notamment un échantillon issu de farines animales

Par premier récipient, on entend tout type de contenant susceptible de recevoir un milieu de culture, tel que notamment un flacon, une bouteille, un sac Stomacher®... Il peut être 20 avantageux que ce premier récipient tolère une variation de pression, lors notamment d'une variation de température. Ainsi, si le premier récipient est fabriqué dans un matériau solide (telle qu'une bouteille en verre), il est avantageux que ce premier récipient soit ouvert, ou soit munie d'une valve permettant une variation de pression. Lorsque le premier récipient est fabriqué dans un matériau flexible, tel que notamment, un sac Stomacher®, il peut être ouvert ou fermé, puisque la variation de pression est permise par la flexibilité du matériau.

25 Par milieu de culture, on entend un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à la viabilité et à la croissance des cellules. Un tel milieu de culture est bien connu de l'homme du métier, qui pourra aisément choisir le milieu de culture le plus adéquat quant aux bactéries qu'il souhaite détecter.

Par milieu sélectif, on entend un milieu permettant de sélectionner les bactéries qui doivent réagir avec le système de détection des bactéries. Lorsque l'on souhaite sélectionner par exemple une bactérie donnée, le milieu sélectif comprend un antibiotique dirigé contre les autres espèces bactériennes, susceptibles d'être présentes dans l'échantillon, et que l'on ne
5 veut pas détecter. Un autre exemple consisterait en ce que ce milieu sélectif comprend un composé toxique contre certaines bactéries particuliers. On peut utiliser encore un milieu restrictif nutritionnellement pour certaines bactéries. De tels milieux sélectifs sont bien connus de l'homme du métier qui choisira un milieu sélectif approprié en fonction de l'échantillon et des bactéries qu'il souhaite analyser. Ce milieu sélectif peut être mélangé au milieu de culture
10 ou isolé dans un deuxième récipient comprenant le système de détection.

Par deuxième récipient, on entend tout type de contenant susceptible de recevoir au moins un système de détection tel que défini ci-dessous. Ce deuxième récipient est préférentiellement dans un matériau suffisamment rigide, pour que son volume reste constant lorsqu'on applique à l'intérieur de ce deuxième récipient, une diminution de température. Ce deuxième récipient
15 peut être compris dans le premier récipient afin que l'utilisateur ne dispose que d'un seul dispositif comprenant l'ensemble des moyens nécessaire à la détection et/ou à l'identification de bactéries.

Par système de détection, on entend un système qui permet de mettre en évidence la présence d'une bactérie donnée. Un tel système est bien connu de l'homme du métier et on peut
20 citer, à titre indicatif, un système de détection comprenant un substrat chromogénique, fluorogénique, basé sur la détection d'une immunoprécipitation, une immunochromatographie, un indicateur de pH, un produit précipitant... Cette détection peut être directe, c'est-à-dire par détection de la bactérie, ou indirecte, par détection notamment d'un métabolite libéré par l'édit bactérie.

Par moyen de transfert, on entend tout moyen permettant le transfert d'un milieu liquide compris dans un premier récipient vers un deuxième récipient. Ce moyen de transfert et le
25 deuxième récipient peuvent être indépendants, ou constituer une pièce unique.

Ainsi, l'invention présente un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présents dans un échantillon, liquide ou solide, caractérisé en ce que :

- a. on place, dans un premier récipient, l'échantillon susceptible de contenir lesdites bactéries dans un milieu de culture liquide,
- b. on dispose d'un deuxième récipient comprenant au moins un système de détection desdites bactéries,
- 5 c. on dispose d'un moyen de transfert entre le premier récipient et le deuxième récipient,
- d. on applique une température T1 à l'intérieur du deuxième récipient puis,
- e. on applique une température T2 à l'intérieur du deuxième récipient
- f. la température T1 est supérieure à la température T2 de sorte que l'on transfère un
- 10 volume défini de milieu de culture du premier récipient vers le deuxième récipient ,
- g. on détermine la présence ou l'absence de bactéries et/ou on identifie les bactéries au niveau du système de détection.

Les bactéries peuvent être notamment d'une manière non limitative les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Niesseria*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Campylobacter*,
15 *Listeria*...

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le moyen de transfert comprend au moins une première ouverture au niveau du premier récipient et au moins une deuxième ouverture au niveau du deuxième récipient.

Il est bien entendu que le transfert entre le premier récipient et le deuxième récipient ne
20 s'effectue pas spontanément. Il faut par exemple que la première ouverture au niveau du premier récipient soit située au dessous de la deuxième ouverture au niveau du deuxième récipient, afin d'éviter tout transfert spontanée par gravité. Ce transfert spontané peut être évité également lorsque le moyen de transfert est un conduit non capillaire, empêchant tout transfert spontanée entre le premier récipient et le deuxième récipient par simple capillarité. Le
25 diamètre interne de ce conduit peut être compris notamment entre 0,1 et 5 mm, préférentiellement entre 0,5 et 2 mm.

Préférentiellement, le deuxième récipient circonscrit un premier volume d'air entre la deuxième ouverture et le système de détection et/ou le moyen de transfert circonscrit un deuxième volume d'air entre la première ouverture et la deuxième ouverture. Si le deuxième récipient

comprend en outre, entre la deuxième ouverture du moyen de transfert et le système de détection, un milieu sélectif, le volume d'air est préférentiellement circonscrit entre la deuxième ouverture du moyen de transfert et le milieu sélectif.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le deuxième récipient et le moyen de transfert sont dans des matériaux suffisamment rigides pour rester à un volume constant lors d'une variation de température. Ainsi, lorsqu'on passe d'une température T1 à T2, le premier volume d'air, et/ou le deuxième volume d'air agissent comme un poumon d'aspiration en subissant une diminution de pression.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, T1 est compris entre 20 et 45°C, et plus préférentiellement entre 30 et 42°C ; T2 est compris entre 4 et 30 °C, préférentiellement entre 13 et 18°C.

Lors de l'étape f) le volume défini que l'on transfert est notamment dépendant de la différence de température que l'on applique, ainsi que du deuxième volume d'air. Le volume défini que l'on transfert peut être notamment compris entre 100 et 1000 µl, et préférentiellement entre 400 et 600 µl. Ainsi, à titre indicatif, lorsque la différence de température (T2 - T1) est de 22°C, et que T1 = 15°C et T2 = 37°C, un volume de 350 µl est transféré du premier récipient vers le deuxième récipient. Il est également possible de réaliser les étapes d) à f) plusieurs fois, afin de transférer, en plusieurs fois, le volume défini permettant la détection des bactéries.

Lors de l'étape g), la détermination de la présence ou l'absence de bactéries et/ou l'identification des bactéries dépend du système de détection qui est utilisé.

Selon une variante de réalisation de l'invention, on effectue, entre l'étape a) et l'étape b), un étape de pré enrichissement qui consiste à augmenter le nombre de bactéries que l'on souhaite détecter. Une telle étape de pré enrichissement est bien connue de l'homme du métier, qui l'adaptera aisément selon les bactéries qu'il souhaite détecter.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le deuxième récipient est compris dans le premier récipient.

L'invention concerne également un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présentes dans un échantillon, liquide ou solide, caractérisé en ce que :

- a. on place, dans un premier récipient, l'échantillon susceptible de contenir lesdites bactéries dans un milieu de culture liquide, tel que défini précédemment,
- 5 b. on dispose d'un deuxième récipient comprenant au moins un système de détection desdites bactéries, tel que défini précédemment,
- c. on dispose d'un moyen de transfert entre le premier récipient et le deuxième récipient, tel que défini précédemment,
- d. on applique une température T1 à l'intérieur du premier récipient puis,
- 10 e. on applique une température T2 à l'intérieur du premier récipient
- f. la température T1 est inférieure à la température T2 de sorte que l'on transfère un volume défini de milieu de culture du premier récipient vers le deuxième récipient ,
- g. on détermine la présence ou l'absence de bactéries et/ou on identifie les bactéries au niveau du système de détection.

15 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le deuxième récipient et le moyen de transfert sont dans des matériaux suffisamment rigides pour rester à un volume constant lors d'une variation de température.

20 L'invention concerne également un dispositif de détection et/ou d'identification de bactéries dans un échantillon comprenant

- un deuxième récipient comprenant au moins un système de détection, et
- au moins un moyen de transfert entre un premier récipient et le deuxième récipient, ledit moyen de transfert comprenant au moins une première ouverture au niveau du premier récipient et au moins une deuxième ouverture au niveau du deuxième
- 25 récipient.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le deuxième récipient circonscrit un premier volume d'air entre la deuxième ouverture et le système de détection et/ou le moyen de transfert circonscrit un deuxième volume d'air entre la première ouverture et la deuxième

ouverture, lesdits premier et deuxième volumes d'air agissant comme un poumon d'aspiration lorsqu'on applique une diminution de température au sein notamment du deuxième récipient.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le premier récipient et le moyen de transfert sont dans des matériaux suffisamment rigides pour rester à un volume constant lors
5 d'une variation de température.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la première ouverture au niveau du premier récipient est en position inférieure par rapport à la deuxième ouverture au niveau du deuxième récipient, afin d'éviter notamment tout transfert par pesanteur entre le premier
récipient et le deuxième récipient.

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la première ouverture au niveau du premier récipient et la deuxième ouverture au niveau du deuxième récipient constitue la même ouverture. Dans ce mode de réalisation, le moyen de transfert se limite alors à cette même ouverture.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le moyen de transfert est un conduit
15 non capillaire, afin d'éviter notamment tout transfert par simple capillarité entre le premier récipient et le deuxième récipient.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le dispositif tel que défini ci dessus comprend, en outre, un premier récipient comprenant un milieu de culture. Selon un mode
particulier, le deuxième récipient est compris dans le premier récipient. Préférentiellement, le
20 premier récipient est un sac stomacher®. Le sac stomacher® peut alors comprendre un filtre, entre le milieu de culture ou est placé l'échantillon alimentaire, et le moyen de transfert, afin d'éviter que des fragments de l'échantillon alimentaire ne bouche la première ouverture et empêche le transfert du milieu de culture du premier récipient vers le deuxième récipient .

25 L'invention concerne enfin un kit de détection et/ou d'identification de bactéries pour la mise en œuvre du procédé tel que défini précédemment.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

Ainsi, la figure 1 présente un premier mode de réalisation de l'invention, tel que présenté dans l'exemple 1. Le premier récipient (1) est un sac stomacher® comprenant un milieu de culture (2) dans lequel est placé l'échantillon, susceptible de contenir les bactéries que l'on souhaite détecter et/ou identifier. Le deuxième récipient (4) comprend un système de
5 détection (6) qui est un milieu liquide sélectif comprenant un indicateur formant un précipité lorsqu'il est en présence de la bactérie que l'on souhaite détecter et/ou identifier. Ce deuxième récipient est relié à un moyen de transfert (3), qui plonge dans le milieu de culture (2) comprenant l'échantillon. Ce moyen de transfert comprend une première ouverture (7) au niveau du premier récipient (1) et une deuxième ouverture (8) au niveau du deuxième récipient
10 (4). Un premier volume d'air (9) est circonscrit entre la deuxième ouverture (8) et le système de détection (6). Un deuxième volume d'air (16) est également circonscrit au sein du moyen de transfert (3) entre la deuxième ouverture (8) et la première ouverture (7).

La figure 2 présente un autre mode de réalisation de l'invention, tel que présenté dans l'exemple 2. Le premier récipient (1) est un contenant ouvert comprenant un milieu de culture
15 (2) dans lequel est placé l'échantillon que l'on souhaite analyser. Le moyen de transfert (3) est comparable à celui de la figure 1. Le deuxième récipient (4) comprend un premier volume d'air (9), tel que défini dans la figure 1, et une colonne de cellulose (10) dans laquelle est imbibé un milieu sélectif (5). Au sommet de la colonne de cellulose (10) est placé le système de détection (6) qui est un substrat chromogénique immobilisé passivement sur un disque de
20 papier stérile.

La figure 3 présente un autre mode de réalisation de l'invention, tel que présenté dans l'exemple 3, qui trouve une application préférentielle lors de la détection de bactéries motiles. Le premier récipient (1) est un contenant ouvert comprenant un milieu de culture (2) dans lequel est placé l'échantillon que l'on souhaite analyser. Le moyen de transfert (3) est
25 comparable à celui de la figure 1. Le deuxième récipient (4) comprend un premier volume d'air (9) tel que défini dans la figure 1, un milieu sélectif (5) semi solide, et un système de détection (6) qui est un substrat chromogénique immobilisé passivement sur un disque de papier stérile. Un cylindre (11) contraint, après l'étape de transfert, les bactéries motiles à migrer à travers le milieu sélectif avant d'atteindre le système de détection.

La figure 4 présente un autre mode de réalisation de l'invention, tel que présenté dans l'exemple 4. Le premier récipient (1) est un contenant ouvert comprenant un milieu de culture (2) dans lequel est placé l'échantillon que l'on souhaite analyser. Le moyen de transfert (3) est comparable à celui de la figure 1. Le deuxième récipient (4) comprend un premier volume d'air (9) tel que défini dans la figure 1, et un système de détection (6) qui est une bandelette d'immunochromatographie, bien connue de l'homme du métier, comprenant une première partie (12) contenant un conjugué anticorps anti bactéries marqué, une deuxième partie (13) qui est une membrane de chromatographie, sur laquelle on peut détecter un premier signal (14) caractéristique de la présence des anticorps anti bactéries que l'on souhaite détecter, et un deuxième signal (15), caractéristique de la présence d'un témoin positif. Le papier absorbant (17) permet la migration des bactéries, même si elles ne sont pas motiles.

La figure 5 présente un autre mode de réalisation de l'invention. Le premier récipient (1) est un tube d'analyse biologique comprenant un milieu de culture (2) dans lequel est placé l'échantillon que l'on souhaite analyser. Le deuxième récipient (4) comprend un premier volume d'air (9) tel que défini dans la figure 1, et un système de détection (6) et un milieu sélectif (5). Dans ce mode de réalisation, la première ouverture au niveau du premier récipient (1) et la deuxième ouverture au niveau du deuxième récipient (4) constitue la même ouverture : le moyen de transfert (3) se limite alors à cette même ouverture. Cette ouverture ne doit pas permettre le transfert spontané de milieu de culture entre le premier et le deuxième récipient.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1- Détection de *Staphylococcus aureus* sur un milieu sélectif liquide comprenant un indicateur

Un dispositif de détection et/ou d'identification de bactéries présent dans un échantillon tel que présenté dans la figure 1 est utilisé dans cet exemple pour la détection de bactéries *Staphylococcus aureus*.

Pour cela, 225 ml de milieu de culture (2) (eau peptonée, bioMérieux, ref 42043) est introduit dans premier récipient (1) qui est un sac stomacher®, et 25 ml de lait, et le mélange est inoculé avec 3×10^4 cellules *Staphylococcus aureus*, selon un protocole classique tel que connu de l'homme du métier. Un test contrôle est obtenu par l'utilisation de milieu de culture et de lait, tel que présenté ci dessus, mais non inoculé par *Staphylococcus aureus*. La partie supérieure d'une seringue de 25 ml est utilisé comme deuxième récipient (4) comprenant un premier volume d'air (9) de 13 ml. Un milieu sélectif (5) (Qi-Staph®, bioMérieux) est utilisé, et 3 ml de ce milieu sélectif sont introduit à l'intérieur du deuxième récipient (4). Dans cet exemple, le système de détection (6) est un composé-indicateur (tellurite de potassium) qui permet l'apparition d'un précipité noir en présence de bactéries *Staphylococcus aureus*. Le moyen de transfert (3) utilisé dans cet exemple est un conduit, d'un diamètre interne de 1 mm et une longueur de 12 cm, dont 4 cm pénètrent à l'intérieur du deuxième récipient (4), tel que présenté dans la figure 1. Ce moyen de transfert (3) comprend une première ouverture (7) qui est immergé dans le milieu de culture (2), et une deuxième ouverture (8) qui rentre à l'intérieur du deuxième récipient (4). Dans cet exemple, le deuxième récipient ne comprend qu'une seule ouverture, qui correspond à ladite deuxième ouverture (8) du moyen de transfert (3), et constitue de ce fait une enceinte fermée à l'exception de l'ouverture (8). Comme présenté dans la figure 1, le deuxième récipient (4) et le moyen de transfert (3) sont placés dans le sac stomacher®. Ceci permet d'isoler le milieu de culture contaminé.

Le transfert du milieu de culture (2) comprenant les bactéries entre le premier récipient (1) et le deuxième récipient (4) est obtenu en plaçant l'ensemble du dispositif dans un incubateur à 37°C pendant une heure. Cette incubation permet le pre enrichissement du milieu de culture. Une incubation plus ou moins longue peut être réalisée selon la contamination de l'échantillon. L'intérieur du deuxième récipient (4) est alors à une température $T1 = 37^\circ\text{C}$. Puis, l'ensemble du dispositif est placé à une température de 15°C pendant une heure, afin que l'intérieur du deuxième récipient (4) soit à une température $T2 = 15^\circ\text{C}$. Cette diminution de température induit alors une diminution de pression au sein du deuxième récipient (4), qui permet le transfert d'un volume défini du milieu de culture (600 µl) du premier récipient (1) vers le deuxième récipient (4). L'ensemble du dispositif est ensuite maintenu durant 18h à 37°C, afin

de permettre aux bactéries de métaboliser le substrat, induisant l'apparition d'un précipité au niveau du système de détection (6). A noter que dans le deuxième récipient (4), le niveau de milieu sélectif (5) n'atteint pas la deuxième ouverture (8), entre le moyen de transfert (3) et le deuxième récipient (5) : lors de l'aspiration, le milieu de culture (2) comprenant les bactéries *Staphylococcus aureus* aspiré est piégé à l'intérieur du deuxième récipient (4), et ne peut refouler dans le premier récipient (1), lorsque qu'on augmente de nouveau la température à l'intérieur du deuxième récipient (4). A la fin de cette incubation, un précipité apparaît au niveau du système de détection, confirmant la présence de *Staphylococcus aureus* lorsque le milieu de culture et le lait était inoculé par ces bactéries. Aucun précipité n'était observé dans le test contrôle.

Exemple 2 - Détection de bactéries *Salmonella typhimurium* sur une colonne de cellulose

Le premier récipient (1) est identique à celui décrit dans l'exemple 1, mais pourrait être tout type de premier récipient. Dans cet exemple, 225 ml de milieu de culture (2) BPW (eau peptonée) dans lequel sont dissous 25g de poudre de lait (issue du commerce) sont inoculés avec 3×10^2 cellules *Salmonella typhimurium*. Le deuxième récipient (4) et le moyen de transfert (3) utilisé dans cet exemple est présenté dans la figure 2 . Un test contrôle est réalisé tel que décrit dans l'exemple 1.

Pour le milieu sélectif (5), 0,5 millilitre de milieu de culture BPW contenant 20 µg de novobiocine sont imbibés sur une colonne de cellulose (10) de 2 cm de long et 0,7 cm de diamètre. Cette colonne de cellulose (10) est placée à l'intérieur du deuxième récipient (4), sans toutefois être en contact avec la deuxième ouverture (8) du moyen de transfert (3). Dans cet exemple, le deuxième récipient (4) ne comprend qu'une seule ouverture, qui correspond à ladite deuxième ouverture (8) du moyen de transfert (3), et constitue de ce fait une enceinte fermée à l'exception de l'ouverture (8). En haut de cette colonne de cellulose (10) est déposé le système de détection (6) qui est un substrat chromogénique, le 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl octanoate (magenta C8) combiné à du nitro bleu tetrazolium (Sigma, N6639), immobilisé passivement sur un disque de papier stérile d'un diamètre de 5 mm (Wathman 3

Chr, ref 3030917). Le transfert du milieu de culture (2) comprenant les bactéries entre le premier récipient (1) et le deuxième récipient (4) est réalisé tel que décrit dans l'exemple 1, en plaçant l'ensemble du dispositif à 37°C pendant 1 heure, puis à 15°C pendant une heure. A la fin du transfert, les bactéries, en contact avec la colonne de cellulose diffusent jusqu'en haut de la colonne, vers le système de détection où elles métabolisent le substrat, pour former un précipité noir. Les résultats positifs sont observés après 15h. Les résultats étaient négatifs lors du test contrôles.

Exemple 3 - Détection de bactéries motiles *Salmonella thyphimurium* sur un milieu sélectif semi solide

Le premier récipient (1) est à celui décrit dans l'exemple 1, mais peut être tout type de premier récipient. Dans cet exemple, 225 ml de milieu de culture (2) BPW (eau peptonée), dans lequel sont dissous 25g de poudre de lait (issue du commerce) sont inoculés avec 3×10^4 cellules *Salmonella thyphimurium*. Le deuxième récipient (4) et le moyen de transfert (3) utilisés dans cet exemple est présenté dans la figure 3. Un test contrôle est réalisé tel que décrit dans l'exemple 1.

A l'intérieur du deuxième récipient (4) sont déposés 3 ml de milieu semi solide (API M-medium®, bioMérieux, ref 50120) et utilisés comme milieu sélectif (5) comprenant 40 µg/ml de novobiocine, sans que le niveau de milieu sélectif (5) n'atteigne la deuxième ouverture (8), entre le moyen de transfert (3) et le deuxième récipient (5). La deuxième ouverture (8) et le système de détection (6) sont séparés par un cylindre (11) tel que présenté dans la figure 3 obligeant les bactéries à migrer à travers le milieu sélectif (5), ce qui fait que seules les bactéries résistantes et motiles parviennent au système de détection (6). Le système de détection (6) est un substrat chromogénique tel que décrit dans l'exemple 2.

Le transfert de salmonelles du premier récipient vers le deuxième récipient est réalisée, d'une façon comparable à l'exemple 1, en plaçant l'ensemble du dispositif à 37°C pendant 1 heure, puis à 15°C pendant une heure.

A la fin de l'étape de transfert, en maintenant l'ensemble du dispositif durant 16h à 37°C, un volume défini de milieu de culture (150 µl) comprenant les bactéries motiles est en contact

avec le milieu sélectif (5), et les bactéries migrent à travers lui, jusqu'au système de détection (6). A la fin de cette incubation, la coloration du disque en noir confirme la présence de salmonelles, initialement présente dans le milieu de culture. Aucun coloration n'était observée lors du test contrôle.

5 **Exemple 4 - Détection de bactéries *Listeria monocytogenes* par immunochromatographie**

Le premier récipient (1) est à celui décrit dans l'exemple 1, mais peut être tout type de premier récipient. Dans cet exemple, 250 ml de milieu de culture (2) (trypcase soya broth, bioMérieux, ref 44011 ; 6% de levure), sont inoculé avec 3×10^7 cfu/ml de *Listeria*
10 *monocytogenes* 4b. Le deuxième récipient (4) et le moyen de transfert (3) utilisé dans cet exemple est présenté dans la figure 4. Un test contrôle est réalisé d'une façon comparable mais sans inoculation par des bactéries.

A l'intérieur du deuxième récipient (4) est placé le système de détection (6) qui est une bandelette d'immunochromatographie bien connu de l'homme du métier. Un test contrôle est
15 réalisé tel que décrit dans l'exemple 1.

Le transfert de *Listeria monocytogenes* du premier récipient (1) vers le deuxième récipient (4) est réalisée par l'incubation de l'ensemble du dispositif à une température $T1 = 30^\circ\text{C}$ pendant une heure, puis une température $T2 = 15^\circ\text{C}$ pendant 45 min. A la fin du transfert, on peut détecter un premier signal (14) caractéristique de la présence d'une protéine présent
20 dans le flagelle de *L. monocytogenes* par réaction avec des anticorps spécifiques et un deuxième signal (15), caractéristique de la présence d'un témoin positif et obtenu par l'utilisation d'anticorps anti IgG de souris. Lors du test contrôle, seul le deuxième signal pouvait être observé.

REFERENCES

1. premier récipient
2. milieu de culture comprenant l'échantillon
- 5 3. moyen de transfert
4. deuxième récipient
5. milieu sélectif
6. système de détection
7. première ouverture
- 10 8. deuxième ouverture
9. premier volume d'air
10. colonne de cellulose
11. cylindre
12. première partie
- 15 13. deuxième partie
14. premier signal
15. deuxième signal
16. deuxième volume d'air
17. papier absorbant

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présentes dans un échantillon, liquide ou solide, caractérisé en ce que :
 - 5 a. on place, dans un premier récipient (1), l'échantillon susceptible de contenir lesdites bactéries dans un milieu de culture (2) liquide,
 - b. on dispose d'un deuxième récipient (4) comprenant au moins un système de détection (6) desdites bactéries,
 - c. on dispose d'un moyen de transfert (3) entre le premier récipient (1) et le
10 deuxième récipient (4),
 - d. on applique une température T1 à l'intérieur du deuxième récipient (4) puis,
 - e. on applique une température T2 à l'intérieur du deuxième récipient (4)
 - f. la température T1 est supérieure à la température T2 de sorte que l'on transfère un volume défini de milieu de culture (2) du premier récipient (1) vers
15 le deuxième récipient (4),
 - g. on détermine la présence ou l'absence de bactéries et/ou on identifie les bactéries au niveau du système de détection (6).
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le moyen de transfert (3)
20 comprend au moins une première ouverture (7) au niveau du premier récipient (1) et au moins une deuxième ouverture (8) au niveau du deuxième récipient (4).
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le deuxième récipient (4)
 circonscrie un premier volume d'air (9) entre la deuxième ouverture (8) et le système
25 de détection (6) et/ou le moyen de transfert (3) circonscrie un deuxième volume d'air (16) entre la première ouverture (7) et la deuxième ouverture (8).
4. Procédé selon l'une quelconques des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que T1 est compris entre 25 et 45°C, préférentiellement entre 30 et 42°C

5. Procédé selon l'une quelconques des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que T2 est compris entre, préférentiellement entre 4 et 24 °C, préférentiellement entre 13 et 18°C.

5

6. Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries présentes dans un échantillon, liquide ou solide, caractérisé en ce que :

- a. on place, dans un premier récipient (1), l'échantillon susceptible de contenir lesdites bactéries dans un milieu de culture (2) liquide,
- 10 b. on dispose d'un deuxième récipient (4) comprenant au moins un système de détection (6) desdites bactéries,
- c. on dispose d'un moyen de transfert (3) entre le premier récipient (1) et le deuxième récipient (4),
- d. on applique une température T1 à l'intérieur du premier récipient (1) puis,
- 15 e. on applique une température T2 à l'intérieur du premier récipient (1)
- f. la température T1 est inférieure à la température T2 de sorte que l'on transfère un volume défini de milieu de culture (2) du premier récipient (1) vers le deuxième récipient (4),
- g. on détermine la présence ou l'absence de bactéries et/ou on identifie les
- 20 bactéries au niveau du système de détection (6).

20

7. Dispositif de détection et/ou d'identification de bactéries dans un échantillon comprenant

- un deuxième récipient (4), comprenant au moins un système de
- 25 détection (6), et
- au moins un moyen de transfert (3) entre un premier récipient (1) et le deuxième récipient (4), ledit moyen de transfert comprenant au moins une première ouverture (7) au niveau du premier récipient (1) et au moins une deuxième ouverture (8) au niveau du deuxième récipient (4).

- 5 8. Dispositif selon la revendication 7 caractérisé en ce que le deuxième récipient (4) circonscrit un premier volume d'air (9) entre la deuxième ouverture (8) et le système de détection (6) et/ou le moyen de transfert (3) circonscrit un deuxième volume d'air (16) entre la première ouverture (7) et la deuxième ouverture (8).
9. Dispositif, selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le moyen de transfert (3) est un conduit non capillaire.
- 10 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 caractérisé en ce que le deuxième récipient (4) est compris dans le premier récipient (1).
11. Kit de détection et/ou d'identification de bactéries pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

1/5

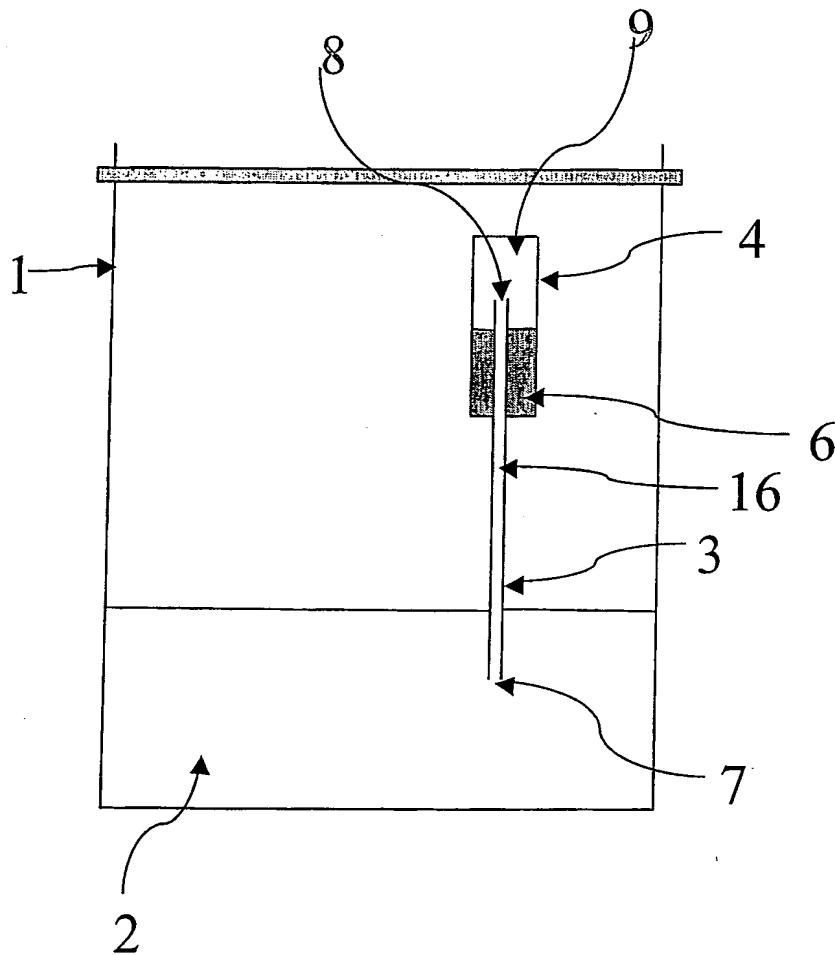


Figure 1

2/5

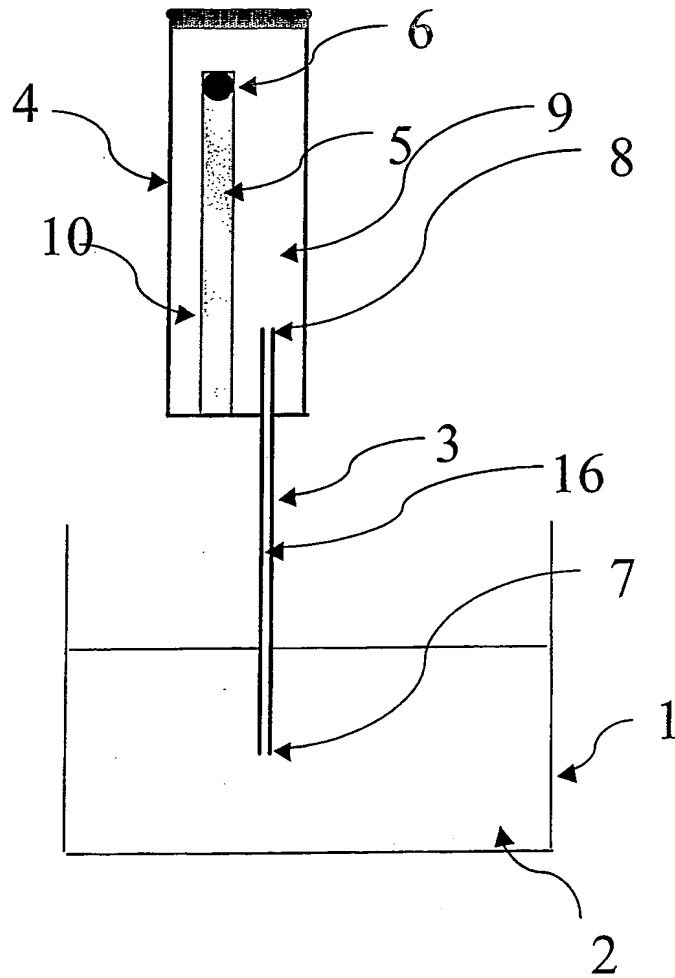
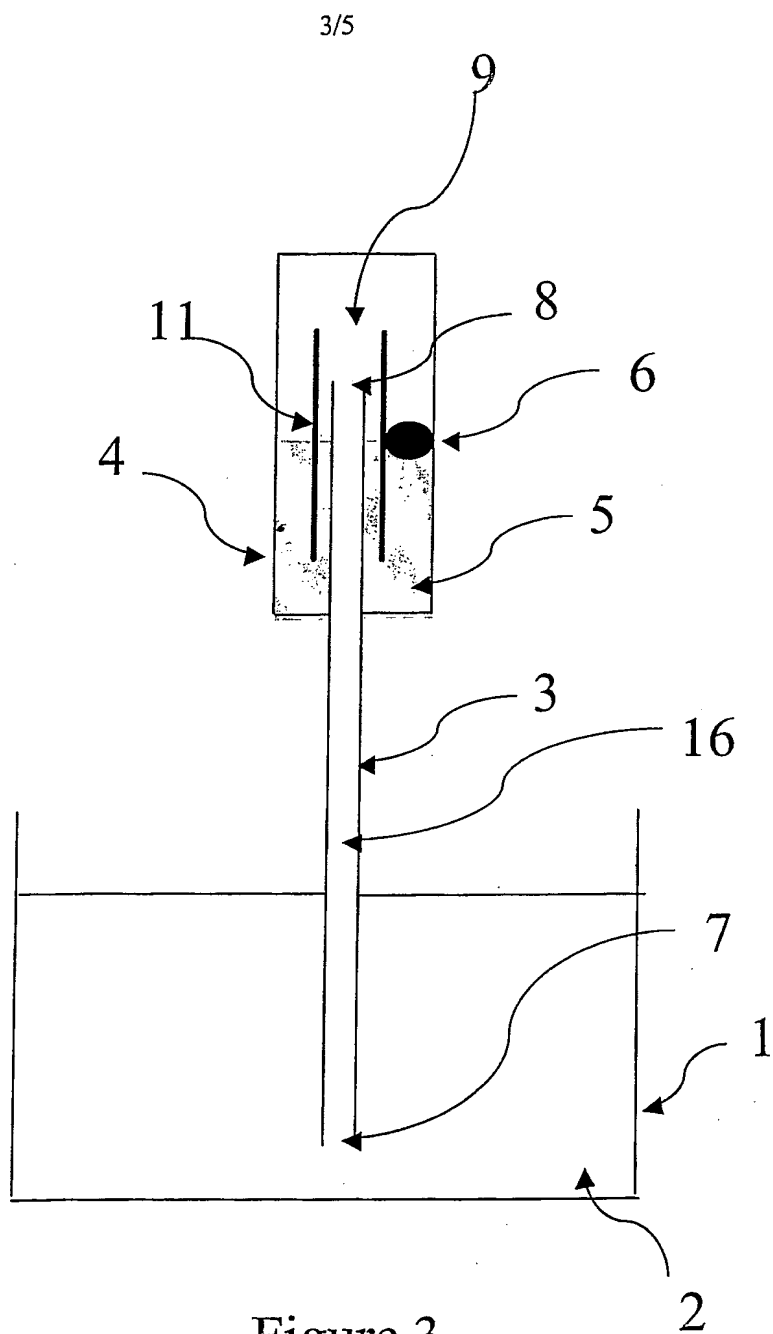


Figure 2



4/5

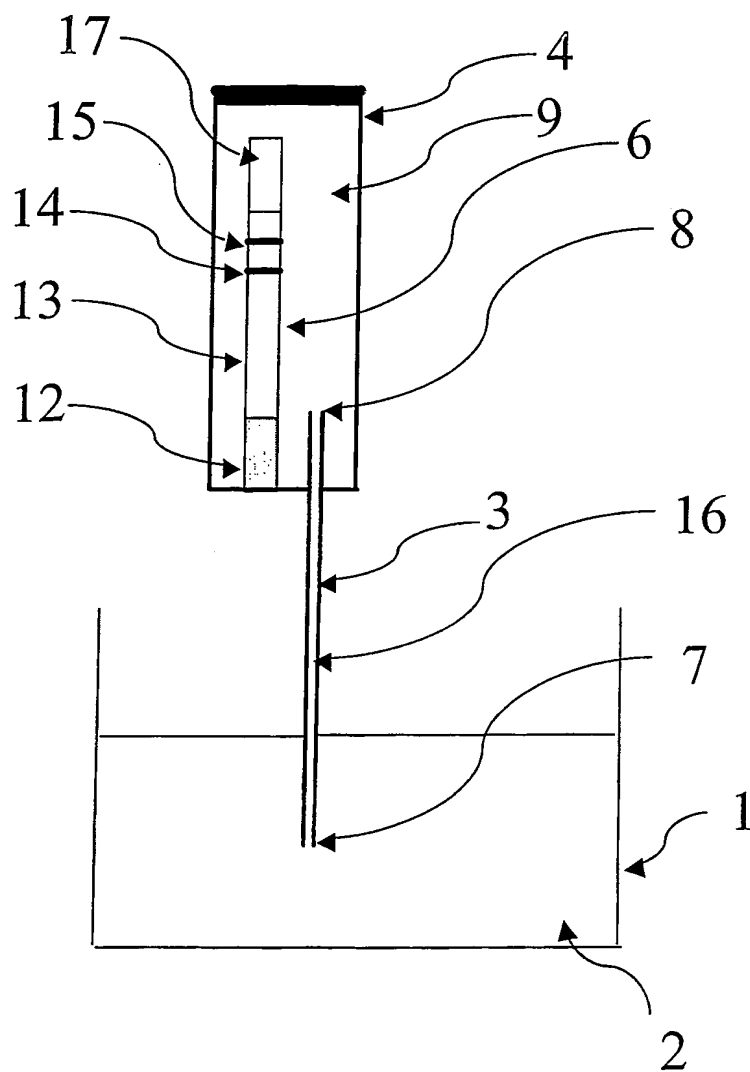


Figure 4

5/5

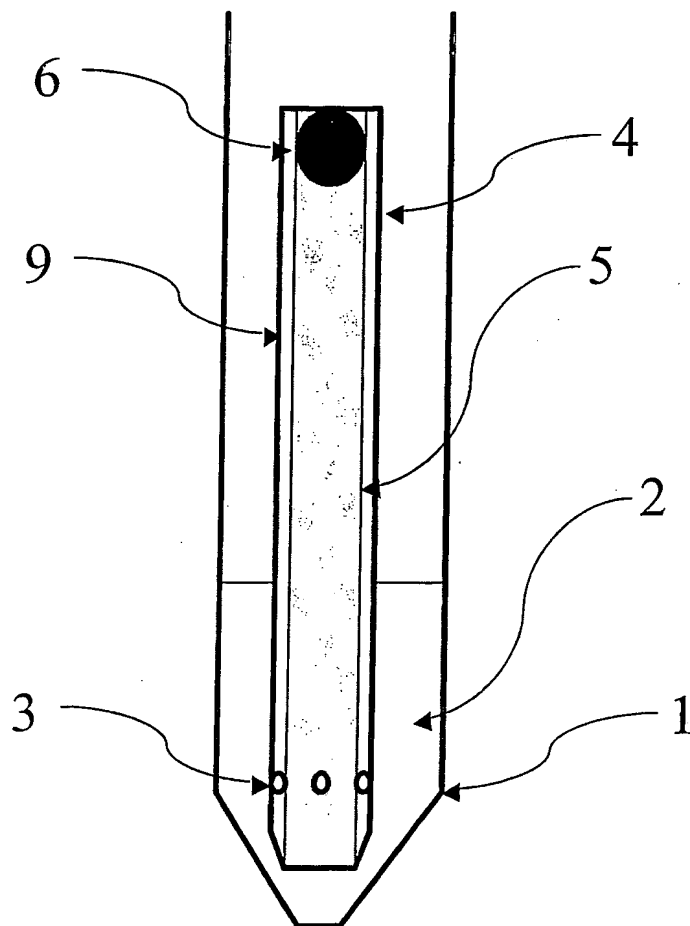


Figure 5

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/04 C12M1/28 C12M1/34 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12M B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 259 116 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 9 March 1988 (1988-03-09) cited in the application page 8, line 8 - page 10, line 23 -----	1-7
A	DE 196 05 753 A (PAUTZ NORBERT) 4 September 1997 (1997-09-04) column 3, line 46 - column 5, line 33 -----	1
A	WO 00/63668 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 26 October 2000 (2000-10-26) abstract -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 2004

Date of mailing of the international search report

07/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tragoustis, M

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0259116	A	09-03-1988	AT 84567 T	15-01-1993
			AU 614936 B2	19-09-1991
			AU 7769887 A	03-03-1988
			CA 1290273 C	08-10-1991
			CN 87106707 A	11-05-1988
			DE 3783540 D1	25-02-1993
			DE 3783540 T2	22-07-1993
			EP 0259116 A2	09-03-1988
			ES 2053550 T3	01-08-1994
			US 5403741 A	04-04-1995
			JP 63112975 A	18-05-1988
DE 19605753	A	04-09-1997	DE 19605753 A1	04-09-1997
WO 0063668	A	26-10-2000	US 6605475 B1	12-08-2003
			EP 1185850 A1	13-03-2002
			JP 2002542024 T	10-12-2002
			WO 0063668 A1	26-10-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/050140

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0259116	A	09-03-1988	AT 84567 T	15-01-1993
			AU 614936 B2	19-09-1991
			AU 7769887 A	03-03-1988
			CA 1290273 C	08-10-1991
			CN 87106707 A	11-05-1988
			DE 3783540 D1	25-02-1993
			DE 3783540 T2	22-07-1993
			EP 0259116 A2	09-03-1988
			ES 2053550 T3	01-08-1994
			US 5403741 A	04-04-1995
			JP 63112975 A	18-05-1988
DE 19605753	A	04-09-1997	DE 19605753 A1	04-09-1997
WO 0063668	A	26-10-2000	US 6605475 B1	12-08-2003
			EP 1185850 A1	13-03-2002
			JP 2002542024 T	10-12-2002
			WO 0063668 A1	26-10-2000